

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



CITOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO
*Estudos do comportamento celular numa linhagem de células osteoblásticas fetais
humanas condicionalmente imortalizadas*

Andreia Bandeira Luís Vieira

Dissertação

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



CITOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO:
*Estudos do comportamento celular numa linhagem de células osteoblásticas fetais
humanas condicionalmente imortalizadas*

Andreia Bandeira Luís Vieira

Dissertação orientada pelo

Prof. Doutor Duarte Nuno da Silva Marques

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2016

*“Ninguém nos pode fazer infelizes,
apenas nós mesmos.”*

São João Crisóstomo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Duarte Marques, meu orientador, porque todas as palavras são poucas para expressar a minha gratidão. A sua forma de Ser e de trabalhar para mim são exemplo e uma motivação a seguir. Agradeço-lhe de igual forma pela oportunidade em pertencer ao GIBBO, uma oportunidade única que me fez crescer em mim o espírito crítico e o meu vício escondido da investigação.

Ao Professor Doutor António Mata, Investigador Principal do Grupo de Investigação em Bioquímica e Biologia Oral, demonstro o meu apreço pela oportunidade de fazer parte deste grupo e a minha gratidão por tudo o que me tem ensinado. A sua sabedoria e o seu espírito crítico são para mim um exemplo.

À Professora Doutora Joana Marques, por todas as horas que estive ao meu lado, ao longo deste projeto. Por toda a amizade, apoio, carinho e motivação e todos os ensinamentos que me deu, agradeço-lhe da forma mais sincera por tudo o que me deu e que me ensinou.

À Dra. Mariana Brito Cruz, por todas as vezes que me lembrou que a metodologia é o mais importante, por todas as gargalhadas e pela amizade que se formou devido “às nossas bichinhas”. Agradeço-lhe também por todas as horas que estive ao meu lado e por todo o conhecimento que me transmitiu.

Ao Professor João Silveira, por todos os conhecimentos ao longo destes 4 anos de GIBBO, por toda amizade e companheirismo, que para mim são muito importantes, é alguém que para mim é uma referência.

À Carlota Mendonça, minha colega, amiga e uma irmã que o GIBBO me deu. A sua alegria contagiante, sinceridade, metodologia, presença são para mim qualidades que prezo bastante. Carlota, obrigada por todos os momentos desde o momento mais silencioso à maior gargalhada.

Ao Dr. João Godinho, ao Dr. Ruben Pereira, à Susana, à Daniela e à Rita por todos os momentos partilhados no GIBBO, recordo todos os momentos com grande carinho.

À Dra. Ana Pequeno pela amizade, carinho e apoio. O meu sincero obrigada.

Ao João Cristino Rodrigues por toda a amizade ao longo destes 5 anos, de ti, amigo, só consigo guardar bons momentos. Guardo com todo o carinho todas as palavras de apoio nos momentos mais difíceis bem como todas as gargalhadas e sorrisos, por tudo o meu sincero obrigada.

À Luana, ao Joel e ao Pedro Gomes, meus fieis amigos que me acompanharam ao longo destes 5 anos, pela amizade e por todos os momentos convosco partilhados, muito obrigada, vou guardar sempre os jantares em casa do Joel.

À Diana, à Rita e ao Diogo por toda a amizade ao longo destes 24 anos de existência.

Aos meus pais, e em especial, à minha Mãe, por tudo o que me proporcionaram desde o primeiro dia de escola até hoje, sem eles, certamente, que hoje não estaria aqui. O meu mais profundo e sincero obrigada por sempre acreditarem em mim.

ii

À Carolina, a minha irmã, por tudo.

Ao Tio Zé Luis, à Tia “Fananda”, à madrinha Guida e aos primos por todo o apoio que me deram sempre e por sempre acreditarem em mim, o meu mais sincero agradecimento.

À madrinha Adozinda, pela sua amizade, sinceridade e alegria. É um exemplo para mim.

À minha tia Ana, por todas as vezes que toca três vezes à campainha, a sua presença e alegria são para mim os momentos mais alegres do dia. A si, muito obrigada.

À tia Bela e ao tio Victor, por toda a amizade e por todos os valores que me ensinaram, para mim são como se fossem meus tios de sangue.

Aos pais do Jorge, a tia São e o tio Jorge, e aos demais familiares por me acolherem como se fosse da família e por todo o apoio e motivação, quero expressar o meu agradecimento e apreço.

A todos os membros da Comissão de Festas da Aldeia da Ribeira, que sempre respeitaram e compreenderam os meus momentos de ausência para me dedicar a este curso, a todos o meu obrigada.

A ti Jorge, por tudo.

RESUMO

Objetivos: Avaliar se peróxido de hidrogénio (PH) resultante da difusão radicular proveniente de técnicas de branqueamento interno é citotóxico uma linhagem de células osteoblásticas. E se a citotoxicidade aumenta em função da concentração e do tempo de exposição.

Materiais e Métodos: As células osteoblásticas (hFOB 1.19) foram cultivadas em placas de 96-poços de cultura, com uma densidade celular de $1,0 \times 10^4$ células/poço, incubadas a 37°C, humidade relativa de 95% e CO₂ a 5%. No primeiro estudo, as células foram expostas ao PH em concentrações entre 0,0 e 15,0 µg/ml por um período de 1 hora, 24 e 72 horas. No segundo estudo, as células foram expostas pelo mesmo período de tempo, em concentrações entre 0,0 e 1,5 µg/ml. Ao fim do tempo de incubação avaliou-se viabilidade celular através de um *kit* baseado na redução da rezasurina. Os valores foram medidos por fluorescência. Captou-se imagens representativas das culturas através do microscopia invertida com óptica de contraste de fase.

Resultados: No primeiro estudo, ao fim de 1 hora de exposição ao PH, a viabilidade diminuiu entre 49,46 e 72,71 % ($p < 0,005$). Após 24 horas de exposição, registou-se uma diminuição entre 76,42 e 79,04 % ($p < 0,005$) atingindo o mínimo às 72 horas, em que a viabilidade tem um decréscimo de 93,3 a 95,2% ($p < 0,005$). No segundo estudo, após uma hora de incubação, registaram-se diminuições de viabilidade entre 55,18 e 50,15% ($p < 0,005$) enquanto que às 24 horas de exposição observou-se um decréscimo de viabilidade entre 62,02 e 64,89%. Às 72 horas, o decréscimo de viabilidade situou-se entre 39,25 e 41,21% ($p < 0,005$) comparativamente com o controlo não tratado com H₂O₂.

Conclusão: A exposição ao peróxido de hidrogénio nas concentrações testadas diminuiu significativamente a viabilidade celular das células osteoblásticas. No entanto, não podemos correlacionar diretamente esse decréscimo com o tempo de exposição. Serão necessários estudos complementares para confirmar as observações deste trabalho.

Palavras-chave: “branqueamento interno”, “peróxido de hidrogénio”, “reabsorções radiculares”, “difusão extra-radicular”

ABSTRACT

Objectives: To evaluate whether hydrogen peroxide resulting from root diffusion during internal bleaching techniques is cytotoxic for a cell line of conditionally immortalized human fetal osteoblasts (hFOB 1.19) and if cytotoxicity is associated with the concentration and exposure time.

Materials and Methods: Osteoblast cells (hFOB1.19) were cultured in 96-well culture with a cell density of 1.0×10^4 cells / well and incubated at 37 ° C, with a relative humidity of 95% and 5% CO². In a first study, the cells were exposed to hydrogen peroxide (PH) solutions with concentrations ranging between 0.0 µg / ml and 15.0 µg / ml for a period of 1 hour, 24 and 72 hours. In the second study, the cells were exposed during the same time points to H₂O₂ concentrations ranging between 0.0 µg / ml and 1,5 µg / ml. At the end of incubation time, cell viability was assessed using a rezasurin-based kit and measured using a fluorometer.

Results: In the pilot study, after 1 hour of exposure to PH, cell viability decreased between 49.46 and 72.71% (p <0.005). While at the 24 hours, there was a decrease between 76.42 and 79.04% (p <0.005) reaching a minimum at 72 hours when cell viability decreased from 93.3 to 95.2% (p <0.005). In the second study, it was observed that after 1-hour incubation, viability decreased between 55.18 and 50.15% (p <0.005), while after 24 hours of exposure those decreases ranged between 62.02 and 64.89 %. At 72 hours the decrease in viability was between 39.25 and 41.21% (p <0.005) compared to the untreated controls.

Conclusion: PH in the range of concentrations potentially diffusing through the periodontal space after internal bleaching decreases cell viability of osteoblast cells. However, we cannot directly correlate this decrease with duration of exposure. Therefore, further studies are necessary to confirm these findings.

Keywords: “internal bleaching”, “hydrogen peroxide”, “root resorption”, “extra-radicular diffusion”

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
1. A Descoloração Dentária	1
2. O Branqueamento Dentário	1
2.1 Agentes de Branqueamento	2
a) Peróxido de Hidrogénio	2
b) Peróxido de Carbamida	3
c) Perborato de Sódio	3
2.2 Sistemas de Branqueamento	3
2.2.1 Técnicas de Branqueamento Interno	4
a) <i>Walking Bleaching</i>	4
b) Técnica Termocatalítica	4
c) Técnicas de Branqueamento Combinadas	5
3. Riscos e Complicações associados ao Branqueamento Interno	5
3.1 Difusão do Peróxido de Hidrogénio	5
3.2 Reabsorções Radiculares	5
4. Aspetos Legais do Branqueamento	7
5. Fundamentos do Estudo	7
OBJETIVOS	9
MATERIAIS E MÉTODOS	11
1. Cultura Celular	11
2. Poços de Cultura	12
3. Primeiro Estudo	13
3.1 Preparação das soluções de peróxido de hidrogénio	12
3.2 Exposição ao peróxido de hidrogénio	12
4. Morfologia Celular	12
5. Segundo Estudo	13
5.1 Preparação das soluções de peróxido de hidrogénio	13
5.2 Exposição ao peróxido de hidrogénio	13
6. Ensaio de viabilidade celular	13
7. Análise Estatística	14
RESULTADOS	15
1. Morfologia Celular	15
2. Viabilidade Celular	17
2.1 Primeiro Estudo	17
2.2 Segundo Estudo	18
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	24
BIBLIOGRAFIA	25

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

	Página
Figura 1 – Incubadora (Mettler®, Alemanha)	11
Figura 2 – Soluções de Peróxido de Hidrogénio	13
Gráfico 1- Evolução da viabilidade celular, em função da concentração para os três tempos de exposição ao peróxido de hidrogénio. Cada linha corresponde um tempo de exposição apresentando o intervalo de confiança 95%.	16
Gráfico 2- Evolução da viabilidade celular em função da concentração para os três tempos de exposição ao peróxido de hidrogénio. Cada linha corresponde um tempo de exposição apresentando o intervalo de confiança 95%.	17

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Definições do Espectrofluorimetro para Ensaio de Viabilidade Celular	14
Tabela 2- Imagens representativas do aspeto das culturas celulares numa ampliação de 10x em microscópio invertido com ótica de contraste de fase nos diferentes tempos e concentrações de incubação com peróxido de hidrogénio	15

ABREVIATURAS

CO₂ - Dióxido de Carbono

mg/min - miligrama por minuto

% - percentagem

Mg/ml - miligrama por mililitro

nM - nanomole

°C - graus Celcius

cm³ - centímetro cúbico

μl - microlitro

células/ml - células por mililitro

ml - mililitro

μg/ml - micrograma por mililitro

nm - nanómetro

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogénio

H₂O - Água

INTRODUÇÃO

1. A DESCOLORAÇÃO DENTÁRIA

A descoloração dentária é uma alteração da cor do dente. Numa sociedade em que a estética facial e nesta, em particular, o sorriso são altamente valorizados, a preocupação em manter um sorriso harmonioso é cada vez uma preocupação maior (Kihn 2007; Dietschi et al. 2006). O branqueamento dentário surge como uma solução eficaz e conservadora para a diminuição da descoloração dentária, sendo por isto um dos tratamentos estéticos mais procurados (Joiner, 2006; Carey, CM 2014).

As alterações de cor dentária podem ser causadas por vários tipos de pigmentações, podendo estas ser de origem externa - pigmentação extrínseca, ou de origem interna - pigmentação intrínseca. (Alqahtani 2014; Carey 2014; Joiner 2006).

A pigmentação extrínseca resulta da acumulação de pigmentos na superfície externa do dente. Estes provêm de alimentos, bebidas, consumo de tabaco ou da higiene oral deficiente (Kihn 2007; Alqahtani 2014). Este tipo de pigmentação acumula-se na película aderida, como resultado de dois processos; pela reação de açúcares com os aminoácidos ou pela retenção da pigmentação pela própria película (Alqahtani, 2014).

A pigmentação intrínseca consiste na retenção de pigmentos na formação do esmalte e/ou da dentina como é o caso das manchas de tetraciclina, amelogenese imperfeita, dentinogenese imperfeita ou fluorose dentária. Os defeitos no esmalte e/ou da dentina, como os *cracks* de esmalte, também podem originar pigmentos. No entanto, estas pigmentações podem ser provenientes do interior do dente como é o caso das hemorragias pulpares, necrose pulpar, tecido pulpar remanescente, materiais endodônticos, idade, entre outros (Carey 2014; Sulieman 2008; Fearon 2007; Rokaya et al. 2015).

Ao contrário do que acontece com a pigmentação extrínseca, que se consegue remover com procedimentos profiláticos integrados na rotina diária ou em ambiente profissional, a pigmentação intrínseca apenas é passível de ser alterada com técnicas de branqueamento (interno, externo ou combinação de ambos) ou através de soluções prostodônticas como facetas ou coroas dentárias (Joiner, 2006).

2. O BRANQUEAMENTO DENTÁRIO

O Branqueamento Dentário é uma reação química na qual o peróxido de hidrogénio reage com as moléculas do pigmento, quebrando-as, e, por conseguinte,

tornando o dente mais branco (Carey, CM 2014). A sua eficácia depende de fatores como a concentração e o tempo de aplicação. Estudos mostram que os resultados obtidos por um produto de branqueamento com menor concentração num período mais longo de aplicação produz os mesmos efeitos que um produto de elevada concentração num intervalo mais curto de tempo (Meireles et al. 2012).

A avaliação da efetividade do tratamento pode-se avaliar através de diversas metodologias. Uma das metodologias sugeridas faz uma comparação simultânea do dente com uma escala de com padronizada. É um método de avaliação subjetivo que pode ser facilmente alterável através das condições de luz, experiência do médico, idade, maquilhagem, fadiga do clínico entre outros. Além deste sistema subjetivo, existem outros como, as fotografias de comparação de antes e depois do tratamento.

Como método de avaliação objetiva da cor existem os colorímetros e ou espectrofotometricos que medem a cor de um objeto. É uma leitura em três dimensões elaborada pela Comissão International de l'Eclairage (CIE): L – que mede a luz do objeto e quantifica numa escala de 0 a 100 em que 0 corresponde a um preto perfeito e 100 a uma reflexão perfeita; a – que mede os vermelhos (positivos) e os verdes (negativos) e por fim o b – que avalia os tons amarelos (positivo) e os azuis (negativos). Para valores de a e b perto de zero situamo-nos numa zona em que predominam tons neutros crescendo a intensidade com o aumento da magnitude (Joiner 2006; Torres et al. 2010).

2.1 AGENTES DE BRANQUEAMENTO

Os agentes de branqueamento dentário utilizados poderão possuir como princípio ativo o peróxido de hidrogénio, peróxido de carbamida, peróxido de sódio (Alqahtani 2014; Plotino et al. 2008) e o perborato de sódio (Plotino et al. 2008).

Além destes agentes ativos, os produtos de branqueamento são compostos por espessantes, como o carbopol, que aumentam a viscosidade e a libertação de oxigénio; transportadores como a glicerina que ajudam a dissolver outros ingredientes; surfactantes que permitem a difusão do produto de branqueamento; entre outros produtos como os aromas e conservantes que tornam a utilização mais fácil do produto e permitem que seja conservado (Alqahtani 2014).

a) Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (PH) é o principal agente de branqueamento. É uma molécula oxidante, altamente instável que quando se degrada, se transforma em radicais

livres de oxigénio. Em circulação podemos encontrar peróxido de hidrogénio exógeno, derivado dos produtos de branqueamento, ou endógeno.

O peróxido de hidrogénio endógeno é produzido pelo fígado e metabolizado por várias enzimas como a peroxidase, dismutase e a superóxido peroxidase. Destas a peroxidase salivar é a mais eficiente sendo capaz de decompor 29 mg/min de peróxido de hidrogénio (Sulieman 2008).

O mecanismo de ação do peróxido de hidrogénio ainda não está bem definido (Kihn 2007; Li & Greenwall 2013). O peróxido de hidrogénio é um agente oxidante com baixo peso molecular, o que facilita a sua difusão pelos tecidos duros do dente. Durante o processo de difusão, o peróxido de hidrogénio sofre clivagem originando as espécies reativas de oxigénio. Estes radicais livres de oxigénio em contacto com as moléculas de pigmentação, induzem a quebra da dupla ligação, transformando-as em moléculas de menor dimensão e estruturas lineares (Alqahtani 2014; Kihn 2007). Quando a luz incide no dente, a sua reflexão provoca uma sensação de dente branco porque as moléculas apresentam-se fragmentadas em moléculas de menor dimensão (Joiner 2006; Kihn 2007).

b) Peróxido de Carbamida

O peróxido de carbamida é uma molécula mais estável, sendo a sua reação mais lenta do que a do peróxido de hidrogénio (Tredwin et al. 2006). Ao reagir, liberta peróxido de hidrogénio e ureia (Carey 2014). O peróxido de hidrogénio ao reagir origina água, oxigénio e ureia. Uma molécula de peróxido de carbamida é composta por 3,5 partes de peróxido de hidrogénio e 6,5 partes de ureia, assim sendo para um produto com 10% de peróxido de carbamida contém aproximadamente 3,5% de peróxido de hidrogénio. (Li & Greenwall 2013; Basson 2013).

Tanto o peróxido de hidrogénio com o de carbamida são agentes eficazes de branqueamento (Hahn et al. 2013).

c) Perborato de Sódio

O perborato de sódio, comumente usado para branqueamentos internos, é uma molécula estável no seu estado sólido, mas quando misturado com água reage, libertando metaborato de sódio, peróxido de sódio e oxigénio (Plotino et al. 2008).

2.2 SISTEMAS DE BRANQUEAMENTO

Existem disponíveis no mercado vários sistemas e técnicas de branqueamento tanto interno como externo ou uma combinação de ambos. Estas diversas metodologias variam de acordo com o agente de branqueamento, concentração, tempo de aplicação, formato e modo de aplicação (Kihn 2007).

O branqueamento interno é uma opção conservadora, para o tratamento de dentes não vitais com alteração de cor (Dahl & Pallesen 2003). Existem várias técnicas de branqueamento interno. Estas podem ser exclusivamente internas ou combinadas com técnicas de branqueamento externo (Plotino et al. 2008; Alqahtani 2014).

2.2.1 Técnicas de Branqueamento Interno

a) *Walking Bleaching*

A técnica *Walking Bleaching* foi descrita inicialmente em 1961 e tem sido atualizada ao longo do tempo. Inicialmente utilizava-se o perborato de sódio em mistura com a água, mais tarde, optou-se por usar o perborato de sódio com peróxido de hidrogénio (Tredwin et al. 2006). No seguimento das novas diretrizes da Comissão Europeia, atualmente, usa-se como agente de branqueamento gel de peróxido de carbamida a 10%.

O agente de branqueamento é introduzido na câmara pulpar e trocado a cada 3 a 7 dias até se obter o resultado pretendido (Plotino et al. 2008; Alqahtani 2014; Dahl & Pallesen 2003; Kotifaottzidoti & Lambrianidis 1996). A grande particularidade desta técnica é o selamento do canal: são removidos os 2mm de guta-percha abaixo da junção amelo-cementária e esta área é selada com ionómero de vidro ou ionómero de vidro modificado com resina (Plotino et al. 2008). O selamento da guta-percha com o ionómero de vidro evita a difusão do peróxido de hidrogénio para os tecidos periodontais (Plotino et al. 2008).

No fim da aplicação do produto de branqueamento, a abertura coronária é encerrada.

b) *Técnica Termocatalítica*

Esta técnica foi proposta baseada no pressuposto que a difusão do peróxido de hidrogénio aumenta em função do aumento da temperatura (Plotino et al. 2008), no entanto, é uma técnica que já se encontra em desuso devido ao número de casos de reabsorções radiculares externas (Plotino et al. 2008; Lee et al. 2004).

Em consultório, aplica-se o agente de branqueamento na câmara pulpar e submete-se o dente a uma luz ou a uma fonte de calor (Alqahtani 2014). No fim da consulta, o agente de branqueamento é selado na câmara pulpar tal como na técnica *walking bleaching* (Plotino et al. 2008).

c) Técnicas de Branqueamento Combinadas

Este tipo de branqueamento, consiste em combinar branqueamento interno com branqueamento de dentes vitais ou externo, o caso mais comum é combinar o branqueamento interno com um sistema de branqueamento em ambulatório. No entanto pode somente combinar-se sistemas *in-office* ou sistemas ambulatoriais com modificações à técnica *walking bleaching* (Plotino et al. 2008; Alqahtani 2014).

3. RISCOS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADOS AO BRANQUEAMENTO INTERNO

Os efeitos adversos associados ao branqueamento interno mais frequentes são locais. Destes incluem-se os efeitos do peróxido de hidrogénio nos tecidos duros do dente, sensibilidade dentária (caso exista contacto com dentes vitais, ou seja, um tratamento combinado), interferência com o sistema adesivo, reabsorções radiculares externas (Plotino et al. 2008).

5

3.1 Difusão do Peróxido de Hidrogénio

Como já referido, o peróxido de hidrogénio é um agente oxidante com características que facilitam a sua difusão ao longo dos tecidos duros do dente (Alqahtani 2014).

A difusão de peróxido de hidrogénio através dos túbulos dentinários para os tecidos periodontais envolventes pode ser exacerbada devido a diversos fatores (Plotino et al. 2008). Nestes, incluem-se a idade do paciente – dado que a dentina jovem apresenta os túbulos dentinários mais abertos (Plotino et al. 2008), presença de defeitos de esmalte junto da Junção Amelocementaria (Lee et al. 2004; Plotino et al. 2008) ou a técnica utilizada (Plotino et al. 2008; Goldberg et al. 2010), história prévia de trauma ou a concentração de peróxido de hidrogénio (Dahl & Pallesen 2003; Goldberg et al. 2010) também influenciam a difusão de peróxido de hidrogénio.

3.2 Reabsorções Radiculares

As reabsorções radiculares consistem na perda de tecido duro do dente, nomeadamente de cemento e dentina, por ação dos odontoblastos. Estas podem ser internas ou externas, podendo-se subdividir em várias classificações na qual se encontram as reabsorções radiculares externas cervicais (Patel et al. 2009).

Reabsorção radicular externa cervical é uma lesão assintomática que se deteta meses ou anos após o branqueamento interno, sendo por isso considerada um achado radiográfico (Plotino et al. 2008; Patel et al. 2009). Clinicamente, pode apresentar como um exsudado através da papila, manchas rosa ou sensibilidade à percussão (Plotino et al. 2008). À sondagem observa-se hemorragia espontânea e aumento da profundidade de sondagem. A não ser que seja uma reabsorção muito extensa, os testes de vitalidade dentária dão uma resposta normal. Radiologicamente encontramos uma zona radiolúcida na zona cervical / proximal com margens irregulares na qual o canal radicular está bem definido (Patel et al. 2009)

O mecanismo responsável por esta reabsorção ainda não está completamente descrito (Tredwin et al. 2006). A evidência existente é escassa, existindo apenas estudos do tipo *case report* ou *case series*, o que limita o conhecimento existente sobre estes processos. Assim, a etiologia e patogénese dos mesmos, bem como a sua epidemiologia estão ainda por clarificar, embora tenham sido levantadas hipóteses explicativas do fenómeno, em seguida discutidas.

Em relação à etiologia surgem como possíveis fatores de risco o trauma, o tratamento ortodôntico, a terapia periodontal além do branqueamento interno (Patel et al. 2009). Considerando, o branqueamento interno, existem duas hipóteses, sendo que a primeira se baseia no pH dos produtos de branqueamento, que poderá potencialmente desencadear um processo inflamatório nos tecidos periodontais (Plotino et al. 2008; Tredwin et al. 2006; Dahl & Pallesen 2003); ao passo que a segunda é fundamentada pela desnaturação proteica causada pelo peróxido de hidrogénio dos produtos de branqueamento, resultando assim numa potencial reação imunológica de corpo estranho (Dahl & Pallesen 2003; Plotino et al. 2008). A desnaturação proteica também pode ser causada pelo calor (utilizado por exemplo, na técnica termocatalítica) (Plotino et al. 2008).

Quando se opta por efetuar um branqueamento dentário com a técnica termocatalítica, introduzem-se três fatores que aumentam o risco de uma reabsorção

radicular: a temperatura que aumenta a difusão do peróxido de hidrogénio, o calor, e o aumento dos radicais hidroxilo que oxidam os tecidos (Plotino et al. 2008).

O tratamento das lesões depende da localização e da dimensão das mesmas. Desta forma, o tratamento pode, numa situação mais favorável, passar pela obturação da mesma, ou numa situação mais desfavorável levar à exodontia do dente (Plotino et al. 2008).

4. ASPECTOS LEGAIS DO BRANQUEAMENTO

Em 2014, a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde - o INFARMED, através do despacho n.º 1136/2014 de 13 de Janeiro, veio regulamentar a utilização de produtos de branqueamento dentário com peróxido de hidrogénio ou com a libertação deste para um teto máximo de 6% de Peróxido de Hidrogénio (Despacho n.º 1136/2014, de 13 de janeiro; Diário da República, 2.ª série, n.º 16, de 23 de janeiro de 2014).

Estas recomendações do INFARMED vêm no seguimento de diretivas Europeias que aconselham um teto máximo de 10% de peróxido de carbamida sendo concentrações que garantem eficácia e segurança (Regulamento (EU) n.º 344/2013 da Comissão, de 4 de abril).

No mesmo despacho o INFARMED, com bases em diretrizes europeias, estipulou que produtos com concentrações de peróxido libertado inferior a 0,1% são considerados cosméticos, sendo de venda livre enquanto produtos com concentrações superiores à referida anteriormente deverão ser disponibilizados exclusivamente pelo médico dentista. (Regulamento (CE) n.º 1223/2009, de 30 de novembro).

O perborato de sódio, preconizado como o principal agente de branqueamento para branqueamentos internos, foi recentemente proibido. A Comissão Europeia proibiu a sua utilização bem como dos demais elementos do grupo dos boratos pelo perigo que estes induzem para a Saúde Pública. Esta proibição vem no seguimento da classificação como sendo uma substância carcinogénica, mutagénica ou tóxica para a reprodução (in <https://www.ond.pt/noticias/2015/05/boratos-proibicao-europa>, a 18 Junho 2016).

5. FUNDAMENTAÇÃO DO ESTUDO

Baseado no atual estado de conhecimento sobre difusão de peróxido de hidrogénio através dos tecidos dentários até ao espaço peri-radicular e sobre a ocorrência de lesões reabsorção radicular cervical, importa esclarecer qual a resposta das células presentes nestes tecidos, em particular dos osteoblastos, responsáveis por assegurar uma correta

saúde e homeostasia do osso alveolar, na presença de peróxido de hidrogénio em concentrações no espectro de concentrações permitidas para a prática clínica.

OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como objetivo fundamental a implementação e validação de uma técnica de cultura celular de uma linhagem de célula osteoblásticas e a validação de um protocolo de avaliação de citotoxicidade de agentes em solução, providenciando a consolidação de um recurso inexistente à data de início deste trabalho na FMDUL.

Complementarmente, são objetivos deste estudo:

1. Avaliar se peróxido de hidrogénio resultante da difusão radicular proveniente de técnicas de branqueamento interno é potencialmente citotóxico para as células periodontais, utilizando como modelo uma linhagem de células osteoblásticas fetais humanas condicionalmente imortalizadas (hFOB 1.19).

H0: O peróxido de hidrogénio resultante da difusão radicular proveniente de técnicas de branqueamento interno não é citotóxico para as células periodontais, nomeadamente para os osteoblastos

H1: O peróxido de hidrogénio resultante da difusão radicular proveniente de técnicas de branqueamento interno é citotóxico para as células periodontais, nomeadamente para os osteoblastos

2. Avaliar se o peróxido de hidrogénio resultante da difusão radicular proveniente de técnicas de branqueamento interno, apresenta uma citotoxicidade proporcional em função da sua concentração.

H0: Não existe correlação entre a concentração de peróxido de hidrogénio à qual são expostos os osteoblastos e a redução da sua viabilidade.

H1: Existe correlação entre a concentração de peróxido de hidrogénio à qual são expostos os osteoblastos e a redução da sua viabilidade.

3. Avaliar se o peróxido de hidrogénio resultante da difusão radicular proveniente de técnicas de branqueamento interno, apresenta uma citotoxicidade proporcional em função do tempo de exposição.

H0: Não existe correlação entre o tempo de exposição ao peróxido de hidrogénio à qual são expostos os osteoblastos e a redução da sua viabilidade.

H1: Existe correlação entre o tempo de exposição peróxido de hidrogénio à qual são expostos os osteoblastos e a redução da sua viabilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada tem com base o crescimento e a proliferação de uma cultura celular de células osteoblásticas fetais humanas condicionalmente imortalizadas pelo gene SV-40. Para tal foi necessário, a criação de protocolos para o crescimento e passagem celular de forma a obter uma pool de células que nos permitem fazer os ensaios e mais uma vez *standartizar* os protocolos de exposição aos agentes de teste.

É por este motivo que neste trabalho, se realizaram dois estudos, nos quais difere a forma como é feita a exposição das células ao peróxido de hidrogénio.

1. Cultura Celular

As células osteoblásticas fetais humanas condicionalmente imortalizadas pelo gene SV40 - hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372) foram cultivadas de acordo com as normas do distribuidor, utilizando um meio de cultura composto por uma mistura de 1:1 de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium*) (Lonza®, Basileia), Ham's F-12 suplementado com 2,5 nm de L-glutamina (Biowest®, França), 0,3mg/ml de G418 (Roche®, Basileia, Suíça) e 10% de Soro Fetal Bovino (Biowest®, França), de acordo com as indicações da ATCC® para esta linha celular.

As células foram incubadas em incubadora adaptada (Memmert®, Alemanha) a 37°C, num ambiente com 100% de humidade e 5% de Dióxido de Carbono, durante 24 horas (Hélary et al. 2009; Choe et al. 2012; Choi et al. 2012).

Como procedimento padrão, o meio da cultura foi trocado de três em três dias. Quando o frasco de cultura atingiu uma confluência aproximada de 100%, procedeu-se à passagem das células usando Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®, St. Luoís, Missori, EUA) para destacar as mesmas.

A contagem do número de células viáveis foi efetuada através de hemocítómetro (câmara de Neubauer) utilizando *Trypan-Blue* (AMRESCO®, Cleveland, Ohio, EUA) para coloração de células viáveis.



Figura 1 - Incubadora (Memmert ®, Alemanha)

2. Poços de cultura

Numa placa de cultura de 96 poços (VWR[®], EUA), foi introduzido em cada poço um volume de 200 µl de meio de cultura com uma densidade celular de $1,0 \times 10^4$ células/ml. As placas foram colocadas na incubadora adaptada (Memmert[®], Alemanha) a 37 °C, num ambiente com 100% de humidade e 5% de Dióxido de Carbono, durante 24 horas.

Após decorridas 24 horas, o meio de cultura foi removido e foram adicionadas as soluções de peróxido de hidrogénio de acordo com o protocolo estabelecido.

Foram realizados dois protocolos: um primeiro estudo onde foi aferida a resposta celular em 5 pontos de concentração de peróxido de hidrogénio e um estudo subsequente onde foram testadas mais concentrações e aumentando o número de replicados por concentração por forma a concretizar de forma mais completa o comportamento celular em resposta a este agente.

3. PRIMEIRO ESTUDO

3.1 Preparação das soluções de peróxido de Hidrogénio.

Foram preparadas 6 soluções de peróxido de hidrogénio, com diferentes concentrações (0,0 µg/µl; 0,5µg/µl; 1,0 µg/µl; 2,5 µg/µl; 6,0 µg/µl; 10,0 µg/µl) tendo cada solução um volume total de 2ml. Estas soluções foram realizadas através de uma solução-mãe de peróxido de hidrogénio a 3% (Sigma-Aldrich[®], St. Luoís, Missori, EUA), em que o solvente utilizado foi água ultra-purificada.

3.2 Exposição de peróxido de hidrogénio

De um volume 200 µl de cada poço, substituiu-se 100 µl por uma solução de peróxido de hidrogénio. Como permaneceu 100 µl de meio de cultura, as soluções de peróxido de hidrogénio foram adicionadas com o dobro da concentração para perfazer a concentração pretendida quando estivesse em contacto com as células e o meio de cultura.

As amostras foram novamente incubadas com as mesmas indicações por um período de 1 hora, 24 horas e 72 horas. Ao fim do período de exposição realizou-se o ensaio de viabilidade celular. Foram realizados 3 ensaios para cada concentração.

4. Morfologia Celular

Com o recurso a uma maquina fotográfica Canon[®] (Tóquio, Japão) EOS 60D e lente macro de 100 mm Canon[®] (Tóquio, Japão) com uma ampliação de 10x em

microscópio invertido com ótica de contraste de fase nos diferentes tempos e concentrações de incubação com o peróxido de hidrogénio.

Captou-se as imagens representativas de cada poço, com as diferentes concentrações nos diversos tempos de exposição.

5. SEGUNDO ESTUDO

5.1 Preparação das soluções de peróxido de Hidrogénio.

Foram preparadas 11 soluções de peróxido de hidrogénio, com diferentes concentrações (0,0 µg/µl; 0,1 µg/µl; 0,15 µg/µl; 0,20 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0,30 µg/µl; 0,35 µg/µl; 0,40 µg/µl; 0,50 µg/µl; 0,75 µg/µl; 1,0 µg/µl) tendo cada solução um volume total de 6ml. Estas soluções foram realizadas através de uma solução-mãe de peróxido de hidrogénio a 3% (Sigma-Aldrich®, St. Luois, Missori, EUA), em que o solvente utilizado foi o meio de cultura preparado anteriormente para a cultura celular

5.2 Exposição de peróxido de hidrogénio

De um volume 200 µl de cada poço, substituiu-se pelo mesmo volume de uma solução de peróxido de hidrogénio. As amostras foram novamente incubadas com as mesmas indicações por um período de 1 hora, 24 horas e 72 horas. Ao fim do tempo de exposição fez-se o ensaio de viabilidade celular. Foram realizados 8 ensaios para cada concentração.

13

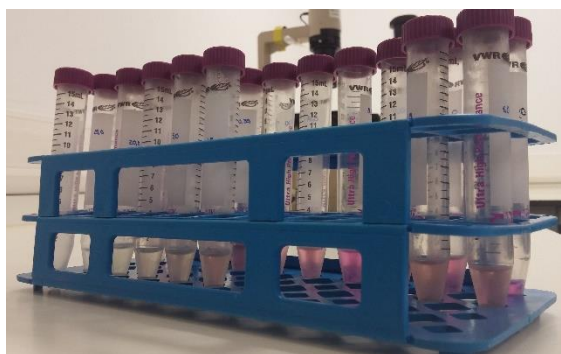


Figura 2- Soluções de Peróxido de Hidrogénio

6. Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade realizou-se de igual forma nos dois estudos.

A viabilidade celular foi testada utilizando o *kit* Celltiter-Blue® (Promega, EUA 2013). Após o período de incubação com o reagente de interesse, foram retirados de cada

poço 100 µl do meio de cultura e adicionados 10 µl do reagente (10%), e foram novamente incubados a 37°C por um período de 3 horas.

Após este período de incubação, as amostras foram transferidas para uma placa de leitura de fluorescência opaca, sendo as amostras lidas num espectrofluorímetro (LS50B - Perkin-Elmer®, Massachusetts, EUA) com as definições definidas na tabela 1.

Espetro de emissão	Espetro de excitação	<i>Split</i>	<i>Gain</i>
560 nm	590 nm	15	<i>Medium</i>

Tabela 1 - Definições do Espectrofluorímetro para Ensaio de Viabilidade Celular


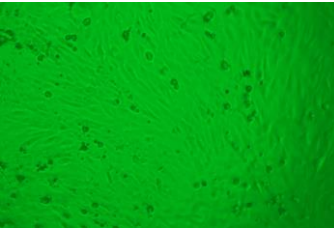
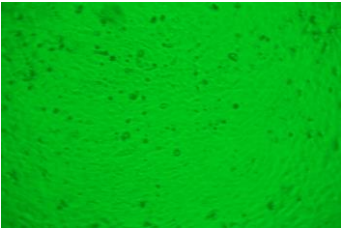
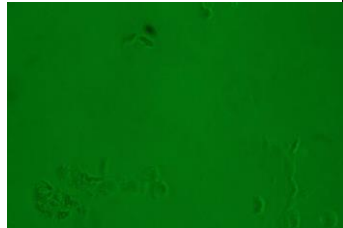
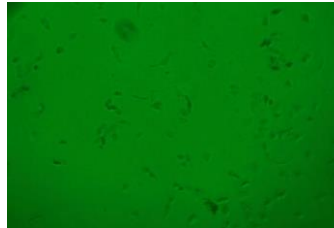
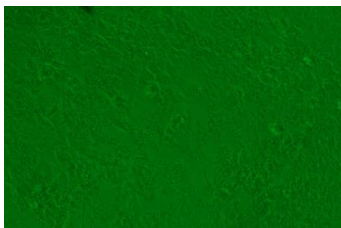



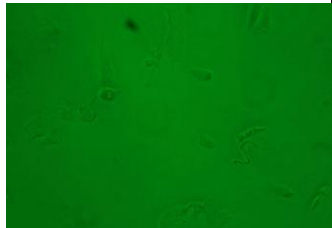
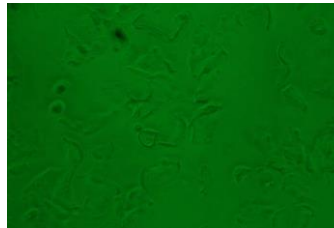

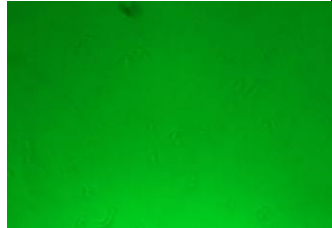

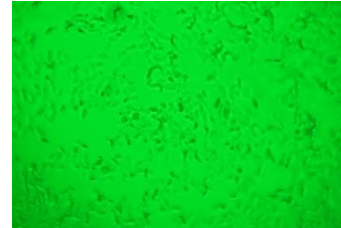
7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo a software apropriado (IBM® SPSS® Statistics 23, Inc, Chicago, IL, EUA). Os dados foram analisados preliminarmente considerando aspetos estatísticos descritivos (frequências, e medidas de dispersão), tendo sido testada a presença de normalidade na distribuição através do Teste de *Kruskal-wallis*. As diferenças na viabilidade celular entre diferentes concentrações e tempos de exposição foram testadas com recurso a ANOVA *one way*, ou através da Correlação de *Pearson* conforme apropriado

Foram usados os testes *Tukey* e correlação de *Bonferroni post-hoc* para identificar os grupos com diferenças estatisticamente significativas. O nível de significância estabeleceu-se para um alfa de 0,05 e um valor de beta de 0,80.

RESULTADOS

1. MORFOLOGIA CELULAR

	1 Hora	24 Horas	72 Horas
0,0 µg/ml			
0,5 µg/ml			
1,0 µg/ml			
2,5 µg/ml			
5,0 µg/ml			




15,0 µg/ml			
------------	---	--	---

Tabela 4 – Imagens representativas do aspeto das culturas celulares numa ampliação de 10x em microscópio invertido com ótica de contraste de fase nos diferentes tempos e concentrações de incubação com peróxido de hidrogénio

2. VIABILIDADE CELULAR

2.1 PRIMEIRO ESTUDO

Após realizado o teste de correlação de *Pearson*, obteve-se uma correlação negativa não significativa entre a diminuição da viabilidade celular e o aumento da concentração. Quando avaliando a correlação entre a viabilidade celular e o tempo de exposição obteve-se uma correlação negativa estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

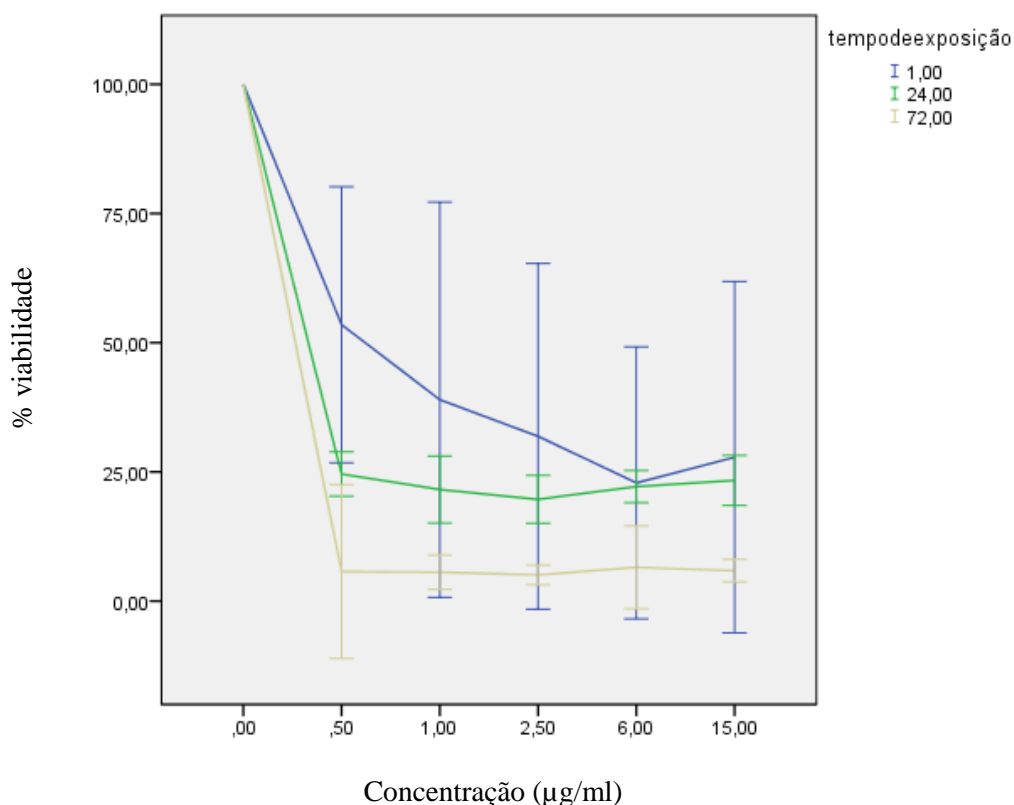


Gráfico 1- Evolução da viabilidade celular em função da concentração para os três tempos de exposição ao peróxido de hidrogénio. Cada linha corresponde um tempo de exposição apresentando o intervalo de confiança 95%

Após análise estatística, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração 0,0 µg/ml e as restantes concentrações em estudo ($p < 0,05$).

Em relação ao tempo de exposição apenas encontram-se diferenças estatisticamente significativas entre 1 hora e 72 horas de exposição ($p < 0,05$).

2.2 SEGUNDO ESTUDO

Após realizado o teste de correlação de *Pearson*, obteve-se uma correlação positiva significativa entre a diminuição da viabilidade celular e o aumento da concentração ($p<0,001$). Quando correlacionado, a viabilidade celular com o tempo de exposição, observou-se uma correlação positiva significativa ($p<0,001$).

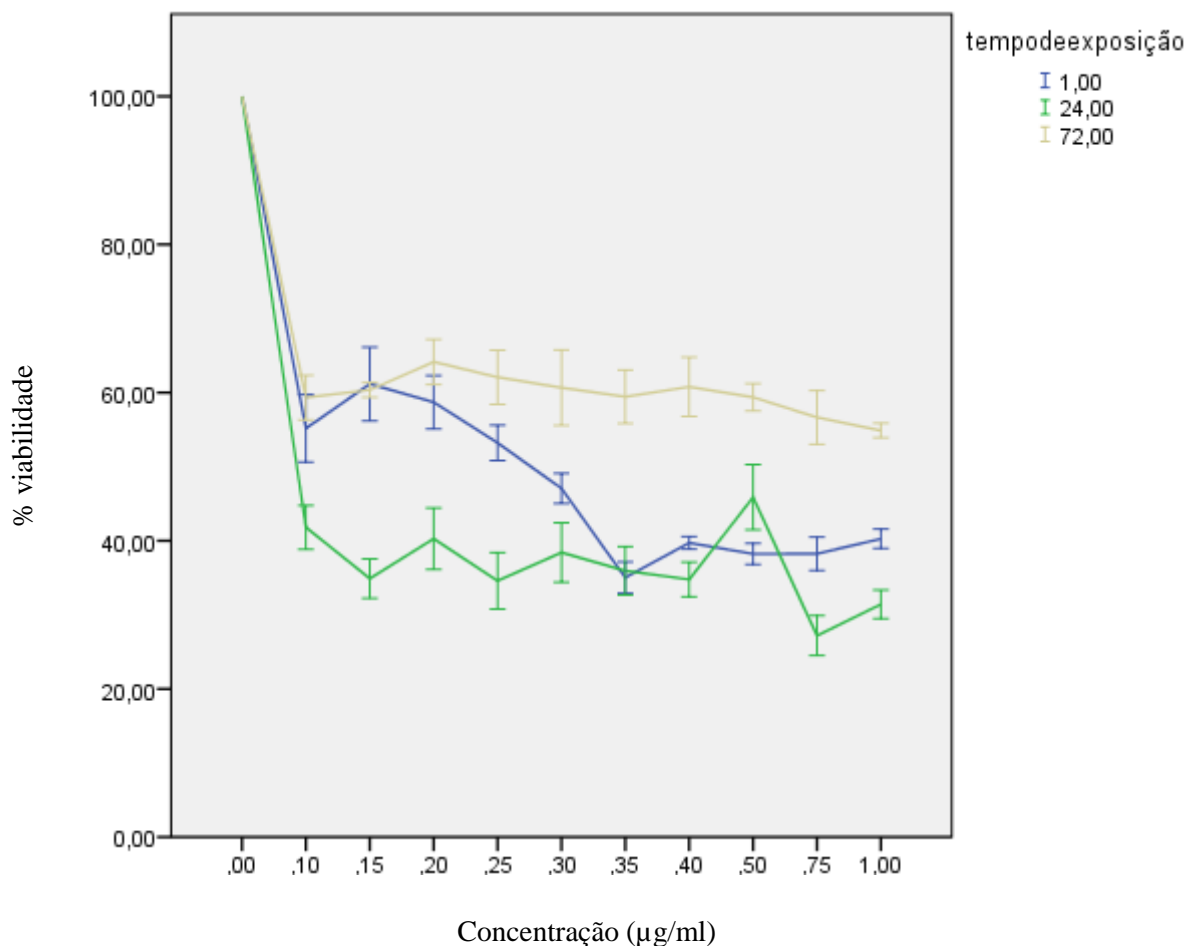


Gráfico 2- Evolução da viabilidade celular em função da concentração para os três tempos de exposição ao peróxido de hidrogénio. Cada linha corresponde um tempo de exposição apresentando o intervalo de confiança 95%

Após análise estatística, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração 0,0 µg/ml e as restantes concentrações em estudo ($p<0,05$). De igual forma, apenas existe uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração 0,20 µg/ml e a concentração 0,75 µg/ml ($p<0,05$)

Em relação ao tempo de exposição encontram-se diferenças estatisticamente significativas entre 1 hora e 24 horas ($p<0,05$), 1 hora e 72 horas de exposição ($p<0,05$) e entre 24 horas e as 72 horas de exposição ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

O presente estudo foi conduzido com o intuito primário de consolidar técnicas e protocolos utilizados em cultura celular e na avaliação do comportamento celular após exposição a agentes a testar. O laboratório de culturas celulares da FMDUL constitui um recurso valioso da instituição tendo entrado em pleno funcionamento em janeiro de 2016.

Desta forma, este trabalho permitiu testar, otimizar e harmonizar protocolos e estratégias experimentais, sendo o conhecimento gerado neste processo de um valor considerável em particular para estudos subsequentes conduzidos nesta infraestrutura.

A linhagem celular utilizada (osteoblastos fetais condicionalmente imortalizados) tem a particularidade de permitir a observação do comportamento e do fenótipo celular primário quando cultivada a temperaturas superiores a 37°C (mimetizando de forma mais exata o observado *in vivo*) assegurando um comportamento imortalizado quando incubada a 34°C o que assegura a continuidade de uma linha celular homogênea, ultrapassado assim as dificuldades de *standardização* e combinação de resultados obtidos com culturas primárias. Todavia, esta é uma linhagem com mais particularidades na sua cultura quando comparada com as linhagens convencionais sendo, a nosso conhecimento, este o único laboratório no nosso país com esta recurso. Assim este objetivo foi alcançado de forma altamente satisfatória, permitindo ainda a aquisição de competências e conhecimentos laboratoriais de cultura celular pela autora deste trabalho.

Como objetivo científico deste trabalho, pretendia-se contribuir para o esclarecimento dos efeitos do contacto com o peróxido de hidrogénio em concentrações potencialmente existentes no espaço peri-radicular após branqueamento interno sobre osteoblastos humanos, usando um estudo de toxicidade celular *in vitro* com células osteoblásticas fetais humanas (hFOB). Por um lado, pretendia-se saber qual o efeito de concentrações crescentes de peróxido de hidrogénio e por outro a resposta destas células após tempos de incubação crescentes (1h, 24h e 72h) a este agente. Este estudo foi conduzido em duas etapas tendo numa primeira etapa sido testadas 5 concentrações entre os 0,5µg/ml e as 15µg/ml. Neste primeiro estudo, obtiveram-se diminuições de viabilidade celular entre 49,46 e 72,71 % ($p<0,005$) para uma exposição de 1 hora ao peróxido de hidrogénio. Para tempos de exposição de 24 horas, a viabilidade celular diminui numa ordem de valores compreendidos entre 76,42 e 79,04 % ($p<0,005$) atingindo o mínimo às 72 horas, em que a viabilidade celular tem um decréscimo de 93,3 a 95,2% ($p<0,005$).

Nos resultados do primeiro estudo verificou-se que a diminuição da viabilidade superior a 50% nas primeiras concentrações em estudo, ou seja, até à concentração de 1,0µg/ml, em todos os tempos de exposição e que atingia uma viabilidade mínima de aproximadamente 95% às 72 horas de exposição ao peróxido de hidrogénio. Após a análise destes resultados, surgiu a necessidade de diminuir o intervalo nas concentrações mais baixas, até 1,0µg/ml de forma a obter um maior espectro de concentrações e assim caracterizar de forma mais exata qual o comportamento destas células em função da concentração de peróxido de hidrogénio e eventualmente identificar qual a concentração potencialmente segura para estas células, tolerada por estas sem alterações significativas/irreversíveis na sua atividade metabólica. Por outro lado, pretendia-se otimizar o modelo de estudo.

Nos resultados do segundo estudo, foram testadas 11 concentrações situadas num intervalo de 0,0 até 1,0 µg/ml de peróxido de hidrogénio, observando-se uma diminuição da viabilidade celular com uma diminuição de viabilidade menos expressiva em função do aumento da concentração de peróxido de hidrogénio. Após uma hora de incubação, registaram-se diminuições de viabilidade entre 55,18 e 50,15% ($p < 0,005$) enquanto que ao fim de 24 horas de exposição observou-se um decréscimo de viabilidade entre 62,02 e 64,89%. Às 72 horas, observou-se um decréscimo de viabilidade situado entre 39,25 e 41,21% ($p < 0,005$) comparativamente com o controlo não tratado com peróxido de hidrogénio. Este aumento comparativo de viabilidade no tempo de incubação mais prolongado parece sugerir uma recuperação da atividade metabólica e eventual divisão das células que não sofreram morte celular na sequência da exposição ao peróxido de hidrogénio. No entanto, é importante considerar que a semivida do peróxido de hidrogénio em solução não estabilizada (como foi o caso em ambos os ensaios), é bastante curto (HERA 2005). Assim, a concentração efetiva de peróxido de hidrogénio às 72h poderá ser bastante inferior ou mesmo nula, o que permitiria uma recuperação da viabilidade e um comportamento celular habitual.

Considerando a variável tempo de exposição, no primeiro estudo existe uma correlação negativa significativa ($p < 0,001$) em relação à diminuição da viabilidade celular. No segundo estudo, onde, o tempo de exposição apresenta uma correlação positiva significativa ($p < 0,001$), que poderá estar relacionada com a atividade metabólica das células.

O fenótipo celular observado no primeiro estudo, não foi coincidente com os resultados de viabilidade obtidos. É notório que no controlo (Tabela 2) podemos observar

uma densidade celular elevada (confluência próxima dos 100%). Quando comparado as imagens obtidas ao fim de 1 hora, 24 e 72 horas nas diversas concentrações verifica-se nas imagens correspondentes às 72 horas uma densidade celular superior ao verificado à 1 hora e às 24 horas. No entanto, a densidade celular observada é menor do que a densidade do controlo. Esta densidade celular verificada às 72 horas, contudo, não significa, que as células sejam viáveis ou que apresentem atividade metabólica. Por esta razão, se compreende a diferença encontrada entre os valores obtidos nos ensaios de viabilidade e a imagem do controlo (tabela 2).

Entre o primeiro e o segundo estudo, podem existir fatores que podem interferir com os dados obtidos. Quando se fizeram as soluções de peróxido de hidrogénio, no primeiro estudo, estas tiveram como base numa solução-mãe de peróxido de hidrogénio a 3% e o solvente usado foi água ultra-purificada. O mesmo não aconteceu no segundo estudo, em que as soluções de peróxido de hidrogénio foram feitas a partir de uma solução-mãe de peróxido de hidrogénio a 3% em que o solvente usado foi meio de cultura. Esta alteração de protocolo justifica-se com o facto de que se ao realizar as diluições de peróxido de hidrogénio com água ultrapura (consequentemente hipotónicas quando comparadas com o ambiente intracelular), tornarem o meio mais hipotónico e assim potencialmente resultarem em alterações do dinamismo celular ou estabilidade da membrana. Por outro lado, o meio de cultura é composto por diversos compostos entre os quais fatores de crescimento, que permitem um melhor desenvolvimento celular, sendo plausível que a diminuição da concentração destes fatores possa ter impacto no comportamento celular. A eliminação deste potencial viés representou uma otimização do protocolo conseguida na segunda fase do estudo.

O ligamento periodontal é um tecido constituído por várias fibras que se localiza entre o osso alveolar e o cimento radicular. A nível celular, encontra-se neste tecido, uma diversidade celular, em que a célula predominante é o fibroblasto. O fibroblasto é uma célula indutora da diferenciação dos osteoblastos, importante na remodelação óssea (Choe et al. 2012). Quando as células do periodonto, e em especial, os osteoblastos estão em contacto com o peróxido de hidrogénio, estas apresentam mecanismos de transdução de sinal, ainda em estudo, que levam à degradação do peróxido de hidrogénio. Nestes mecanismos destaca-se a via ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) que inibe o stress oxidativo, evitando assim uma diminuição da diferenciação osteoblásticas (Bai et al. 2004). Esta via de transdução de sinal, poderá explicar a adaptabilidade das células ao peróxido de hidrogénio.

Por outro lado, sabe-se que o peróxido de hidrogénio é uma molécula altamente instável, que se decompõem em oxigénio e água e que a sua decomposição pode ser acelerada com alterações da temperatura e do pH da solução. O aumento de 10°C, face à sua temperatura de armazenamento, aumenta a taxa de decomposição em 2,5x (Mattos et al. 2003) fator pelo qual pode explicar os resultados obtidos no segundo estudo às 72 horas.

Estudos prévios *in vitro* mostram que o peróxido de hidrogénio aplicado na câmara pulpar, ou seja, intracoronário, tem a capacidade de se difundir ao longo dos tecidos duros da estrutura radicular até ao espaço extra radicular (Plotino et al. 2008; Tredwin et al. 2006; Rokaya et al. 2015; R. Palo et al. 2012; Rotstein 1991), e que esta difusão aumenta com a presença de alterações na estrutura do cimento na superfície radicular (Koulaouzidou et al. 1996; Lee et al. 2004; Rotstein 1991; R. Palo et al. 2012). Mais tarde, outros estudos *in vitro*, que avaliam a difusão do peróxido de hidrogénio vêm demonstrar a sua existência, e que esta, se situa num espectro de concentrações que varia desde 0,34 µg/ml até 4,4µg/ml às 24 horas de exposição (Madhu et al. 2013). Palo e col. em 2012, obtiveram uma média de 1µg/ml de peróxido de hidrogénio após 7 dias de utilização com um produto de branqueamento composto por 35% de peróxido de hidrogénio (R. M. Palo et al. 2012).

22

De acordo com os vários estudos existentes, é passível aferir que os modelos de estudo *in vitro* para a avaliação da difusão do peróxido de hidrogénio são muito heterogéneos com significativas variáveis de confundimento como a presença de uma barreira de ionómero de vidro, defeitos no cimento do esmalte (introduzidos ou naturais), isolamento seletivo dos tecidos dentários, termocatálise, concentrações de peróxido utilizado ou o tempo de aplicação do produto. Por outro lado, todos os modelos *in vitro* para o estudo da difusão do peróxido de hidrogénio apresentam apenas a imersão da porção radicular, ficando a porção coronal exposta ao ar o que poderá resultar numa difusão preferencial por capilaridade para a superfície radicular e consequentemente a introdução de um viés nos resultados. Contudo, pesem embora as limitações destes estudos, estes são de uma forma geral coerentes na demonstração do fenómeno de difusão de peróxido de hidrogénio através da raiz até à sua superfície, e na ausência de modelos mais robustos, as concentrações observadas constituem a estimativa possível do pior cenário a este nível.

As reabsorções radiculares externas cervicais estão fortemente associadas à prática de branqueamento interno, em especial, quando este se efetua com a técnica

termocatalítica e isto se conjuga com elevadas concentrações de peróxido de hidrogénio e história previa de trauma. Após revisão da literatura não foi possível aferir nenhum estudo que avalie o comportamento celular deste tipo de células em específico face ao peróxido de hidrogénio nesta gama de concentrações. Como tal, e, tendo em conta as novas diretrizes da União Europeia e do Infarmed, considerou-se importante correlacionar os efeitos do peróxido de hidrogénio na gama de concentrações atualmente consideradas legais para este efeito nos tecidos periodontais, caracterizando assim a resposta metabólica de uma linhagem celular, face a um produto de branqueamento comumente usado na nossa prática clínica.

Por outro lado, são necessários mais estudos para caracterizar a resposta metabólica das células em resposta a um espectro de concentrações que se situem até 0,1 µg/ml. Da mesma forma, será interessante que estes novos estudos confirmem qual o comportamento celular às 72 horas, dado que existe aparentemente uma contradição entre o primeiro estudo e o segundo estudo. Por forma a confirmar estes resultados, estes estudos subsequentes deverão incluir um número de amostras maior, precedido de um cálculo da dimensão da amostra necessária com base nos dados de desvio padrão desta amostragem.

Será interessante usar adicionalmente linhagens de células fibroblásticas para caracterizar o comportamento destas face ao peróxido de hidrogénio, sendo que estas são como já referido a principal célula do ligamento periodontal.

CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu desenvolver novas técnicas, nunca antes realizadas na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa. Conseguimos com mérito, desenvolver protocolos de crescimento e conservação de uma linhagem celular de osteoblastos. O que nos deu um ponto de partida, para o desenvolvimento de modelos celulares de estudo, *in vitro*, que nos permitiu desenvolver este estudo.

Decorrente das técnicas de branqueamento interno, existe uma difusão de peróxido de hidrogénio, desde a câmara pulpar, até ao espaço extra-radicular. O que resulta na introdução de um agente que perturba a homeostasia do meio.

A exposição ao peróxido de hidrogénio nas concentrações testadas diminui significativamente a viabilidade celular das células osteoblásticas. No entanto, não podemos correlacionar diretamente esse decréscimo de viabilidade com o tempo de exposição.

No futuro, são necessários novos estudos, com uma amostragem maior, e com modelos de estudo mais evoluídos que nos permitam mimetizar de melhor forma o que se passa na cavidade oral.

BIBLIOGRAFIA

- Alqahtani, M.Q., 2014. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dental Journal*, 26(2), pp.33–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sdentj.2014.02.002>.
- Bai, X.-C. et al., 2004. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, pp.197–207.
- Basson, R.G.S.K.T. vW; O.Y., 2013. BassionToothWhitening2013.pdf. , pp.122–129.
- Carey, C.M., 2014. Tooth whitening: What we now know. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 14(SUPPL.), pp.70–76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jebdp.2014.02.006>.
- Choe, Y. et al., 2012. Continuously generated H₂O₂ stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry*, 113(4), pp.1426–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173791>.
- Choi, Y.J. et al., 2012. Cell-penetrating superoxide dismutase attenuates oxidative stress-induced senescence by regulating the p53-p21Cip1 pathway and restores osteoblastic differentiation in human dental pulp stem cells. *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp.5091–5106.
- Dahl, J.E. & Pallesen, U., 2003. Tooth Bleaching--a Critical Review of the Biological Aspects. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(4), pp.292–304. Available at: <http://cro.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154411130301400406>.
- Dietschi, D., Rossier, S. & Krejci, I., 2006. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 37(7), pp.515–526.
- Fearon, J., 2007. Tooth whitening: concepts and controversies. *Journal of the Irish Dental Association*, 53(3), pp.132–140.
- Goldberg, M., Grootveld, M. & Lynch, E., 2010. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: A review. *Clinical Oral Investigations*, 14(1), pp.1–10.
- Hahn, P. et al., 2013. Efficacy of tooth bleaching with and without light activation and its effect on the pulp temperature: An in vitro study. *Odontology*, 101(1), pp.67–

- Hélary, G. et al., 2009. A new approach to graft bioactive polymer on titanium implants: Improvement of MG 63 cell differentiation onto this coating. *Acta biomaterialia*, 5(1), pp.124–33. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706108002377>.
- HERA, 2005. *Hydrogen Peroxide CAS No: 7722-84-1*,
- Joiner, A., 2006. The bleaching of teeth: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, 34(7), pp.412–419.
- Kihn, P.W., 2007. Vital Tooth Whitening. *Dental Clinics of North America*, 51(2), pp.319–331.
- Kotifaottzidoti, E. & Lambrianidis, T., 1996. Role of cemento-enamel junction on the radicular penetration of 30 % hydrogen peroxide during intracoronary bleaching in vitro. , pp.146–151.
- Koulaouzidou, E. et al., 1996. Role of cemento-enamel junction on the radicular penetration of 30% hydrogen peroxide during intracoronary bleaching in vitro. *Endodontics & dental traumatology*, 12(3), pp.146–150. Available at: papers3://publication/uuid/BE2D39E8-03ED-4150-9A1C-F4469D52CD71.
- Lee, G.P. et al., 2004. Extraradicular diffusion of hydrogen peroxide and pH changes associated with intracoronary bleaching of discoloured teeth using different bleaching agents. , pp.500–506.
- Li, Y. & Greenwall, L., 2013. Safety issues of tooth whitening using peroxide-based materials. *British dental journal*, 215(1), pp.29–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23846062>.
- Madhu, K.S. et al., 2013. Comparison of Radicular Peroxide Leakage from four Commonly used Bleaching agents following Intracoronary Bleaching in Endodontically treated teeth - An In Vitro Study. , 5(August), pp.49–55.
- Mattos, I.L. de et al., 2003. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, 26(3), pp.373–380. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000300015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt [Accessed June 25, 2016].
- Meireles, S.S. et al., 2012. Effectiveness of different carbamide peroxide concentrations

used for tooth bleaching: an in vitro study. *Journal of Applied Oral Science*, 20(2), pp.186–191.

- Palo, R. et al., 2012. Quantification of Peroxide Ion Passage in Dentin, Enamel, and Cementum After Internal Bleaching With Hydrogen Peroxide. *Operative Dentistry*, 37(6), pp.660–664. Available at: <http://www.jopdentonline.org/doi/abs/10.2341/11-334-L>.
- Palo, R.M. et al., 2012. Quantification of Peroxide Ion Passage in Dentin , Enamel , and Cementum After Internal Bleaching With Hydrogen Peroxide. , pp.660–664.
- Patel, S., Kanagasingam, S. & Pitt Ford, T., 2009. External Cervical Resorption: A Review. *Journal of Endodontics*, 35(5), pp.616–625. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.01.015>.
- Plotino, G. et al., 2008. Nonvital Tooth Bleaching : A Review of the Literature and Clinical Procedures Nonvital Tooth Bleaching : A Review of the Literature and Clinical Procedures. *Journal of Endodontics*, 34(4), pp.394–407.
- Rokaya, M.E. et al., 2015. Evaluation of Extraradicular Diffusion of Hydrogen Peroxide during Intracoronar Bleaching Using Different Bleaching Agents. , 2015.
- Rotstein, I., 1991. In vitro determination and quantification of 30% hydrogen peroxide penetration through dentin and cementum during bleaching. *Endodontics*, 72(5), pp.602–606.
- Sulieman, M. a M., 2008. An overview of tooth-bleaching techniques: Chemistry, safety and efficacy. *Periodontology 2000*, 48(1), pp.148–169.
- Torres, C.R.G. et al., 2010. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy--in vitro study. *Journal of dentistry*, 38(10), pp.838–846. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.07.002>.
- Tredwin, C.J. et al., 2006. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *British dental journal*, 200(7), pp.371–376.